דוח סופי לתוכנית מחקר מספר 09-1433-131

חקר מערכות הגנה טבעיות בצמחים נגד מזיקים, כדרך לפיתוח שיטות הדברה חדשניות

Exploring natural plant- defense mechanisms as a new strategy for pest control

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

מוראד גאנם המחלקה לאנטומולוגיה, מכון וולקני, בית דגן

עוז ברזני בנק הגנים הישראלי, מכון וולקני, בית דגן

מגי לוי המחלקה לפתולוגיה של צמחים ומיקרוביולוגיה, הפקולטה לחקלאות, רחובות

Murad Ghanim (PI), Department of Entomology, the Volcani Center, Bet Dagan, Israel
E-mail: ghanim@agri.gov.il

Oz Barazani, Israel Gene Bank, the Volcani Center, Bet Dagan, Israel.
E-mail: barazani@agri.gov.il

Maggie Levy, Department of Plant Pathology and Microbiology, Hebrew University, Rehovot, Israel. E-mail: levym@agri.huji.ac.il

אוקטובר 2012

הממצאים בדוח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא.

חתימת החוקר: _____

תקציר

הצגת הבעיה

המחקר שלנו עוסק בחקר התגובה של כנימת עש הטבק, מזיק עיקרי בארץ ובעולם, לגלוקוזינולאטים אינדוליים, שהם מטבוליטים משניים בצמחים ממשפחת המצליבים שלהם יש תפקידים חשובים באינטראקציה עם חרקים ובהגנה מפני מזיקים ומחלות שונים. חומרים אלה נמצאים בצמח המודל אראבידופסיס.

המטרה של המחקר

המטרה העיקרית של ההצעה שלנו היא חקר התגובה של כנימת עש הטבק לאחר הזנה על מוטנטים שונים של אראבידופסיס הפגועים ביכולתם לייצר גלוקוזינולאטים, כאלה שמייצרים ביתר חומרים אלה או כאלה שמייצרים גלוקוזינולאטים יותר טוקסיים מאחרים.

שיטות העבודה

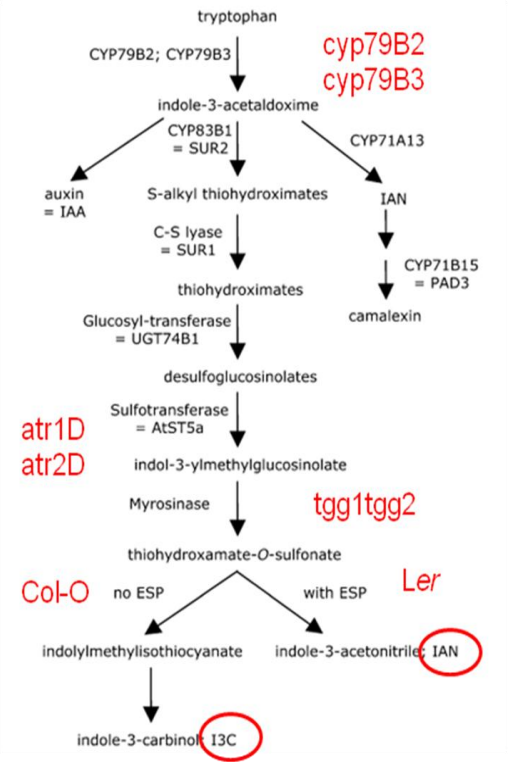
בכל תקופת המחקר השתמשנו במגוון שיטות מחקר וכלים העומדים לרשותנו על מנת לחקור את התגובה של תת המינים השונים B ו- Q של הכנימה לגלוקוזינולאטים במיני בר ובמוטנטים המייצרים גלוקוזינולאטים ביתר או בחסר. השתמשנו בניסויים ביולוגיים, בניסויי כושר הטלה ופוריות וניסויים גנומיים לחקר התגובה הביולוגית והמולקולארית לחומרים אלה. בנוסף, התנהגות ההזנה של שני תת המינים נבדקה על שני טיפוסי בר ועל מוטנטים שונים במערכת רישום ההזנה electrical penetrating graph (EPG). לבדיקה פונקציונאלית של הגנים שזוהו בניסויים הגנומיים פיתחנו מערכת השתקת גנים יעילה בהזנה דרך צמחים ונבדקו מספר גנים שנבחרו מהניסוי הגנומי.

תוצאות עיקריות

מצאנו שהכנימה מגיבה באופן שונה למוטנטים שונים, כאשר באופן כללי רמות גבוהות של גלוקוזינולאטים גורמות לפחות הזנה על צמחים ולהטלת פחות ביצים. מהשוואות הגנומיות ע"י שימוש בשבבי DNA ראינו שגלוקוזינולאטים אינדוליים גורמים לסטרס חמצוני בכנימה, ולתגובה של גנים המעורבים בדה-טוקסיפיקציה במיוחד גנים ממערכת ה- P450 דבר שיכול להסביר את ההעדפה של כנימות לרמות גלוקזינולאטים נמוכות ולהימנע מהזנה והטלה על צמחים עם רמות גבוהות שלהם. תוצאות ה- EPG מצביעות על אותו כיוון של התגובה לגלוקוזינולאטים טוקסיים מאראבידופסיס כפי שנצפה בשנה הראשונה, לדוגמא באקוטיפ Ler לעומת Col-0, ונצפו הבדלים בין המוטנטים השונים שנבדקו. הצלחנו לאסוף רוק ולטפל בצמחים לאנליזה של התגובה. אספנו מספיק דוגמאות לאנליזה של תוצרי הפירוק של גלוקוזינולאטים בכנימה, במערכת העיכול ובטל דבש. בנוסף השווינו דוגמאות RNA לאנליזת ביטוי בתת המינים B ו- Q בעזרת ריצוף אלומינה והצלחנו לפתח פרוטוקול יעיל יותר להשתקת גנים בכנימה ולאמת את הביטוי של חלק מהגנים הקנדידאטים. בשל חוסר זמן ותקציב, אנליזת הרוק והטל דבש לא הושלמה עד כה.

מבוא

כנימת עש הטבק נחשבת לחרק מזיק עיקרי בארץ ובעולם בגלל החלשת הצמחים ע"י הזנה ישירה ובגלל העברת מספר רב של וירוסים צמחיים. הנזקים של הכנימה בעולם נאמדים ב- 1-2 מליארדי דולרים כל שנה. הדרך היעילה ביותר להקטנת נזקי הכנימה היא ריסוסים כימיים שגורמים לפגיעה באדם, בסביבה ובאורגניזמים מועילים. בנוסף, אחת הבעיות של הריסוסים הכימיים היא פיתוח עמידות בקרב חרקים מזיקים. כנימת עש הטבק יכולה לפתח עמידות כמעט נגד כל תכשיר הדברה שקיים היום, ולכן ההדברה הכימית היא תמיד פתרון חלקי. הכנימה הינה המזיק מספר 1 מבחינת דיווחי העמידות שדווחו בכל העולם, דבר שמציב אותה כאחד המזיקים הקשים כיום. אחת הדרכים



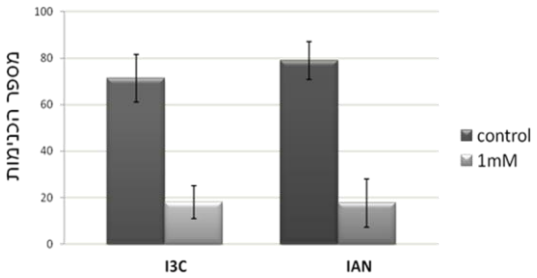
<u>איור 1.</u> מסלול הסינטזה של האינדול-גלוקוזינולאטים המתחיל בטריפטופאן . באדום מוצגים המוטנטים שמשמשים אותנו בניסויי ההזנה, אלו המוקפים בעיגולים אדומים הם תוצרי הגלוקוזינולאטים הסופיים ששימשו בניסויי ההזנה בחומרים סינטטיים.

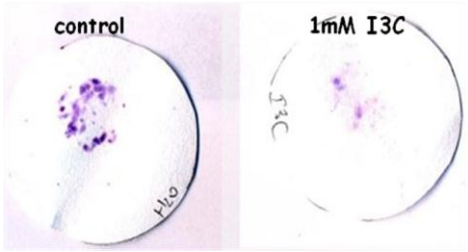
להפחית את הנזק של הכנימה היא פיתוח צמחים עמידים כנגדה. פיתוח צמחים כאלה נעשה על ידי טיפוח צמחים המייצרים חומרי הגנה טבעיים שיכולים להדביר או להפחית את ההזנה של הכנימה. חומרים אלה מיוצרים בד"כ באופן טבעי בצמח ולהם תפקידים רבים שאחד מהם הוא התגוננות בפני מחלות ומזיקים. על מנת לפתח צמחים המייצרים חומרי הגנה טבעיים, דרושה הבנה טובה יותר של מסלולי הגנה אלה כולל התגובה האפשרית של הכנימה. אינדול גלוקוזינולאטים הינם מטבוליטים משניים המיוצרים בצמחים ממשפחת המצליבים ובצמח המודל אראבידופסיס. לחומרים אלה תפקיד באינטראקציה של חרקים עם צמחים ותפקיד בהגנה על הצמח בפני מזיקים. עבודות רבות הראו שחומרים אלה יכולים להפחית משמעותית את ההזנה של חרקים הרביבורים וחרקים מוצצים שונים על צמחי אראבידופסיס שמבטאים ביתר אינדול גלוקוזינולאטים ובכך להקטין את נזקם משמעותית. בפרוייקט זה הראנו בניסויים ביולוגיים שתוצרים סופיים במסלול הגלוקוזינולאטים האנדוליים גורמים לדחייה של כנימת עש הטבק וגרמו לירידה ביכולתה להיזון ולהפריש טל דבש, כאשר הניסויים בוצעו במוטנטים ואקוטיפים שונים של אראבידופסיס. בנוסף ביצענו ניסויים על ידי שימוש בשבבי דנ"א בו הושווה הביטוי הגנטי של כנימות עש להזנה על עלי כותנה מטופלים ב- I3C או ב- IAN ומצאנו שהביטוי של הרבה מאוד גנים משתנה בתגובה לטיפול זה במיוחד עליה בביטוי של הרבה מאוד גנים, כאשר התגובה ל- IAN היא יותר דרסטית מאשר I3C. בנוסף, השווינו את הביטוי הגנטי של תת המינים B ו- Q בתגובה להזנה על מיני בר ומוטנטים שונים, ונמצאה תגובה שונה לחלוטין בהזנה על מוטנטים אלה, לעומת דמיון רב יותר בין שני טיפוסי הבר. חלק מהגנים הקנדידאטים אומתו בעזרת אנליזת PCR כמותי ואנליזת FISH. במחקר למדנו את ההזנה של תת המינים B ו- Q על מוטנטים שונים של אראבידופסיס בעזרת שיטת ה- EPG ומצאנו הבדלים מובהקים בתגובה של שני תת המינים למיני הבר והמוטנטים של אראבידופסיס.

פירוט עיקרי הניסויים

1. <u>הזנה של כנימת עש הטבק על תוצרי פירוק של אנדול גלוקוזינולאטים סינטטיים</u>

בניסויים אלה, צמחי כותנה טופלו בתוצרי פירוק של אנדול גלוקוזינולאטים סינטטיים IAN ו- I3C (איור 1). לאחר הטיפול, נעשו ניסויי בחירה בחמש חזרות, כאשר לכ- 50 נקבות של כנימת עש טבק ניתנה בחירה בין צמח מטופל ב- IAN או ב- I3C לבין צמח לא מטופל.

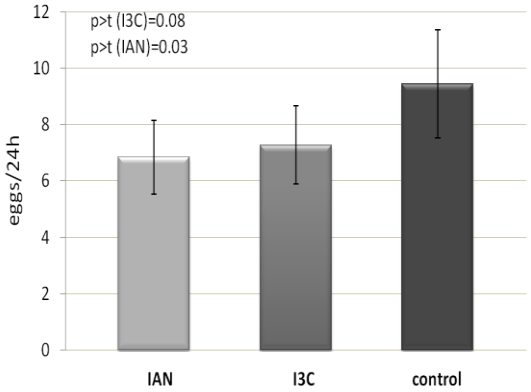




איור 2. למעלה: ניסוי בחירה של כנימת עש הטבק לצמחי כותנה מטופלים ב- IAN 1mM או I3C לעומת בקורת מטופלת במים. למטה: הפרשת טל דבש (נקודות כחולות: טל דבש צבוע בצביעת נינהדרין הצובע חומצות אמינו) לאחר הזנה על עלי כותנה מטופלים ב- I3C 1mM, לעומת הזנה על עלים מטופלים במים

איור 2 מראה כי הכנימות בחרו את הצמחים הלא מטופלים באופן מובהק. ממדידת כמות הטל דבש שהופרשה, מצאנו כי הכנימות גם ניזונו פחות על צמחים מטופלים. בניסוי הטלה ללא בחירה על עלי כותנה מטופלים ב- IAN , I3C ובקורת, העדיפו הנקבות להטיל באופן מובהק על עלים שאינם מטופלים (איור 3). תוצאה זו תומכת בתוצאות הקודמות (איור 2) שהראו שתוצרי הפירוק של האינדול גלוקוזינולאטים הינם חומרים טוקסיים/דוחים. בניסוי זה הראנו גם ש- IAN הינו חומר שדוחה יותר את הכנימה מאשר I3C, תוצאה שנתמכת גם על ידי עבודות אחרות לגבי כנימות עלה.

ייצור IAN מתרחש באקוטיפ LER ולא ב- COL-0 כיוון שב- LER יש את האנזים ESP שמאפשר מעבר זה בסינטזה.

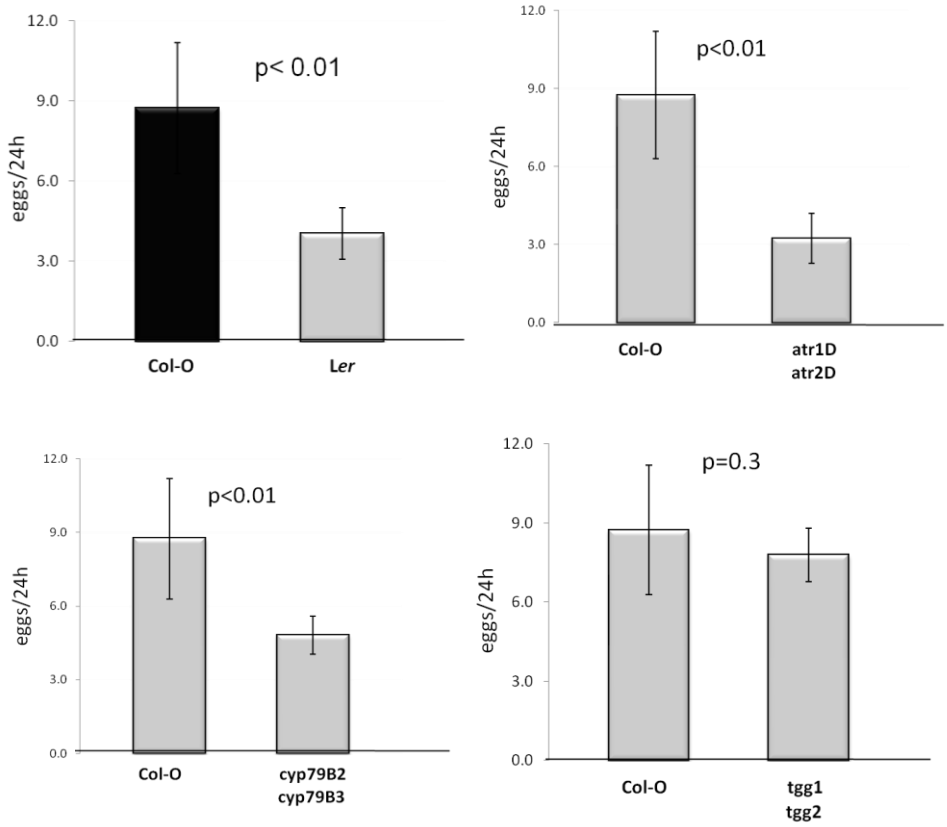


איור 3. הטלה של כנימת עש הטבק על עלי כותנה מטופלים בתוצרי פירוק של אנדול גלוקוזינולאטים לעומת בקורת בניסוי ללא בחירה

2. הזנה של כנימת עש הטבק על מוטנטים של אראבידופסיס במסלול האנדול גלוקוזינולאטים

בניסויים הללו הפוריות של כנימת עש הטבק נמדדה ע"י ניסויי הטלה ללא בחירה על המוטנטים השונים במסלול הסינטזה של האנדול גלוקוזינולאטים. המוטנט הראשון cyp79B2 cyp79B3 אין בו כלל ייצור אנדול גלוקוזינולאטים, המוטנט tgg1 tgg2 שבו יש מוטציה במירוסינאז, והמוטנט atr-1D שבו יש ייצור יתר של האנדול גלוקוזינולאטים. השוונו גם בין שני האקוטיפים COL-0 ו- LER שנבדלים ביניהם בנוכחות האנזים ESP המביא לייצור IAN ב- LER ולייצור I3C ב- COL-0. נמצא שהכנימה מעדיפה להטיל על האקוטיפ COL-0 (איור 4), שלא מכיל את התוצר הסופי IAN, וזה

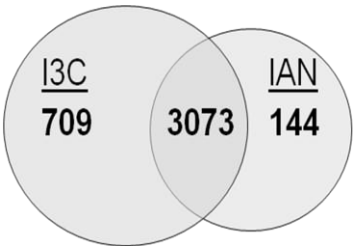
בהתאמה לתוצאות שהתקבלו מניסויי ההעדפה בחלק הראשון, ומאשש שהתוצר הסופי IAN הינו יותר טוקסי לכנימה מאשר I3C הנוצר באקוטיפ COL-0. תוצאות ההטלה על המוטנט atr-1D הראו שכנימת עש הטבק מעדיפה לא להטיל על המוטנט הזה בהשוואה להטלה על COL-0. כאמור במוטנט זה יש ייצור יתר של אנדול גלוקוזינולאטים ולכן ישנה דחייה מובהקת של הכנימה. כאשר השתמשנו במוטנט tgg1 tgg2 שבו יש מוטציה במירוסינאז ההופך את האינדול גלוקוזינולאטים לפעילים לא היו הבדלים בהטלה על מוטנט זה לעומת טיפוס הבר. תוצאה מפתיעה התקבלה כשהשתמשנו במוטנט cyp79B2 cyp79B3 שבו יש חסימה בייצור חומרים אלה ולמרות זאת הכנימות העדיפו את טיפוס הבר (איור 4). יתכן כי החומרים הללו רעילים לכנימות ברמה גבוהה אך הכנימות צריכות רמה מסוימת של חומרים אלו לפוריות וזאת בהתאם למה שידוע ממחקרים על כנימות עלה מתמחות על מצליבים.



איור 4. ניסויי הטלה של כנימת עש הטבק על מוטנטים שונים של אראבידופסיס במסלול הביוסינתזה של אינדול גלוקוזינולאטים, ועל שני אקוטיפים של טיפוס בר הנבדלים ביניהם בתוצרי הפירוק הסופיים של המסלול.

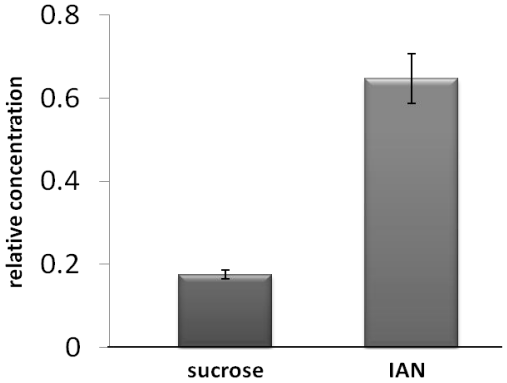
3.ביטוי גנטי של כנימת עש הטבק לאחר הזנה על גלוקוזינולאטים סינטטיים ועל מוטנטים שונים

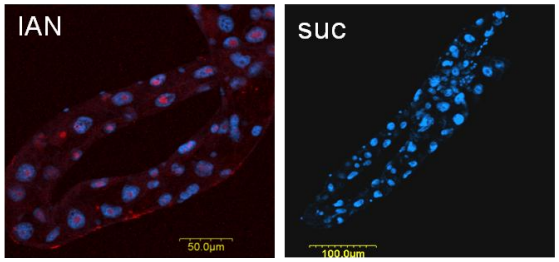
על מנת ללמוד על התגובה של כנימת עש הטבק להזנה על גלוקוזינולאטים ברמת הביטוי הגנטי, בשלב ראשון כנימות נחשפו לעלי כותנה מטופלים בתוצרי הפירוק הסופיים IAN ו- I3C והושוו לכנימות



איור 5. אנליזה כללית של התגובה של כנימת עש הטבק להזנה על עלי כותנה מטופלים ב- IAN או ב- I3C ע״י שימוש בשבבי DNA של הכנימה. 144 גנים ייחודיים עלו בתגובה לטיפול ב- IAN, 709 גנים ייחודיים עלו בתגובה ל- I3C ו- 3073 גנים היו משותפים לשני החומרים

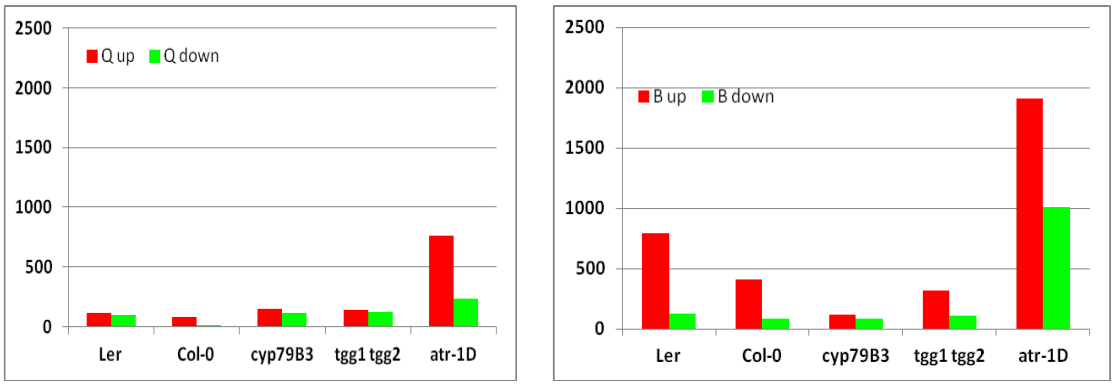
שקיבלו הזנה על עלים לא מטופלים. ההשוואה נעשתה ברמת ה- RNA על גבי שבבי DNA המכילים 6,000 גנים של הכנימה. האנליזה של התוצאות הראתה רק עליה בביטוי הגנטי, כאשר 144 גנים עלו באופן מובהק לאחר הטיפול ב- IAN ו- 709 גנים עלו לאחר הטיפול ב- I3C (איור 5). אולם רוב הגנים, 3073, שעלו היו משותפים לטיפול בשני החומרים, דבר המלמד על כך ששני החומרים מביאים לשינויים דרמטיים בביטוי הגנים אצל הכנימה. ניתן לומר שהרבה מהגנים שעלו היו גנים שקשורים לתגובה למצבי עקה. אחד הגנים שעקבנו אחרי הביטוי שלו על מנת לאמת את התוצאות היה הגן פירוקסירידוקסין, גן גרעיני המעורב בתגובה לעקה חמצונית בתוך התאים הביטוי של הגן פירוקסירידוקסין עלה פי- 3 בניסוי שבבי ה- DNA לעומת הביקורת וכך גם בשיטת ה- RT-PCR הכמותי (איור 6). העלייה גם נצפתה כאשר השתמשנו בשיטת ה- Fluorescence *in situ* hybridization (FISH). באנליזה זו נצפה סיגנל חזק של הביטוי בתוך הגרעינים של תאי המעי האמצעי, לעומת במעי ביקורת שבו לא נצפתה עליה כזו.





איור 6. אנליזה FISH על מעי אמצעי של כנימת עש הטבק שניזונה מתמיסת סוכרוז בתוספת IAN. האנליזה בוצעה עם גלאי DNA ספציפי לגן פירוקסירידוקסין לאחר הטיפול עם שייר פולוצנטי. רואים ביטוי חזק של הגן בתוך הגרעינים בצבע אדום, לעומת העדר ביטוי במעי שנותח מכנימות שניזונו רק מתמיסת סוכרוז (צד ימין)

בשלב השני של הניסויים הגנומיים נעשתה השוואה לבטוי הגנים בכנימות מתת המינים B ו- Q שניזונו למשך 3 ימים על המוטנטים cyp79B2 ,cyp79B3 ,tgg1 tgg2 ו- atr-1D, בנוסף להזנה על טיפוסי הבר LER ו- COL-0. האנליזה נעשתה בריצוף עמוק בשיטת אלומינה על מנת למצוא את מערכות הגנים שמגיבה להזנה על המינים השונים. כפי שמוצג באיור 7, מספר הגנים שעלו או ירדו בהזנה על טיפוסי הצמחים השונים הייתה גבוהה. התוצאות התקבלו רק לפני כחודש ואנו בשלב של קטגורציה ואנליזה למציאת קבוצות הגנים הרלוונטים לניסויים שלנו, אך ברור מהתוצאות כי הרבה מהגנים שהגיבו הם תוצאה של תגובה משנית שאיננה בהכרח קשורה לתגובה לגלוקוזינולאטים.



איור 7. מספר הגנים שעלו (אדום) או ירדו (ירוק) באופן מובהק בכנימת עש הטבק מתת המין Q (שמאל) או B (ימין) כתוצאה מההזנה על טיפוסי בר או מוטנטים במסלול סנטזת הגלוקוזינולאטים האנגוליים.

מהתוצאות המובאות באיור 7 ניתן ללמוד כי התגובה של תת המין B הייתה יותר דרסטית מהתגובה של תת המין Q בתגובה להזנה מכל טיפוסי הצמחים ששימשו לניסויים. תוצאה זו מתאימה להשערה כי תת המין Q מתמודד טוב יותר עם חומרי הגנה של צמחים על ידי הפעלת מערכות אנזימתיות ספיציפיות כאשר אין צורך בהפעלת מערכות אחרות, לעומת זאת תת המין B נחשב ליותר רגיש לחומרים טוקסיים וההתמודדות שלו עם מערכות כאלה היא פחות מוצלחת. התוצאה היא כנראה שתת המין B מפעיל הרבה יותר מערכות על מנת להתמודד עם חומרים טוקסיים בעוד שתת המיQ מתמחה בנטרולם של חומרים כאלה.

ניתן גם ללמוד מהתוצאות האלו ששני תת המינים הגיבו באופן דרסטי להזנה על המוטנט atr-1D שמייצר רמות גבוהות של גלוקוזינולאטים אנדוליים. בנוסף, ניכרת התגובה הדרסטית של תת המין B לטיפוס הבר LER שידוע בייצור תוצר הפירוק IAN שנחשב לטוקסי יותר.

4. Electrical penetrating graph

בשנה השנייה החוקר הראשי נסע לברזיל להשתלמות שמטרתה הייתה לימוד טוב יותר על מערכת ה-EPG בעבודה עם כנימות עש ואנליזה של התוצאות. נרכשה מערכת חדשה של EPG שאפשר בעזרתה לחבר 4 כנימות ולבדוק את התנהגות ההזנה שלהם בו זמנית. בשלב ראשון נעשו בדיקות מקדימות של הזנה על ידי תת המין B על אקוטיפ Col-0 ו- Ler. התוצאות מובאות בטבלה 1. מהתוצאות ניתן לראות שמספר הטעימות על האקוטיפ Ler גבוהה באופן מובהק מהאקוטיפ Col-0 דבר המעיד על הסתגלות יותר מהירה לאקוטיפ Col-0. בנוסף, ניתן לראות שההזנה מהשיפה הינה הרבה יותר ארוכה באקוטיפ Col-0 מאשר באקוטיפ Ler דבר המעיד על קבלה יותר טובה של הצמח. ניתן להסביר את התוצאות הללו בכך שהקוטיפ Ler מכיל תוצרים סופיים יותר טוקסיים לחרקים בסוף מסלול הגלוקוזינולאטים האנדוליים כמו החומר I3C שנבדק בפרוייקט זה. ניסויי EPG הושלמו גם בהזנה על המוטנטים השונים המוצגים באיור והתוצאות מובאות בטבלה 2.

טבלה 1. השוואת נתוני EPG של כנימת עש הטבק מתת המין B על האקוטיפים LER ו- COL-0 (שורות מודגשות מראות פרמטרים מובהקים סטטיסטית בין שני האקוטיפים)

פרמטר נבדק	אקוטיפ Col-0	אקוטיפ Ler	מובהקות מבחן t
זמן בדקות:			
עד הטעימה הראשונה	9±1.2	7.7±0.9	0.112
זמן הטעימה הראשונה	1.9±0.4	1.54±0.2	0.09
מספר כולל של הטעימות	**9±3**	**20±2**	**0.021**
זמן כל הטעימות	**41±3**	**29±5**	**0.001**
הזנה מהעצה G	4.7±0.8	3.9±1.1	0.23
הזרקת רוק לשיפה E1	2.8±0.3	3.2±0.9	0.11
הזנה מהשיפה E2	**56±5**	**26±3**	**0.0023**
מסלול בין התאים (C+B+A)	**132±7**	**192±8**	**0.0026**

טבלה 2. השוואת נתוני EPG של כנימת עש הטבק מתת המין Q על האקוטיפים LER ו- COL-0 (שורות מודגשות מראות פרמטרים מובהקים סטטיסטית בין שני האקוטיפים)

פרמטר נבדק	אקוטיפ Col-0	אקוטיפ Ler	מובהקות מבחן t
זמן בדקות:			
עד הטעימה הראשונה	6±2	5±0.5	0.34
זמן הטעימה הראשונה	1.1±0.7	1.5±0.6	0.56
מספר כולל של הטעימות	11±1	13±5	0.23
זמן כל הטעימות	33±4	31±1	0.33
הזנה מהעצה G	5.2±0.1	6.1±0.8	0.19
הזרקת רוק לשיפה E1	2.8±0.3	3.2±0.9	0.11
הזנה מהשיפה E2	77±1	69±6	0.53
מסלול בין התאים (C+B+A)	154±9	166±5	0.09

טבלה 3. השוואת נתוני EPG של כנימת עש הטבק מתת המין B על המוטנטים cyp79B2 cyp79B3, tgg1 tgg2 ו- atr-1D (שורות מודגשות מראות פרמטרים מובהקים סטטיסטית בין שלושת המוטנטים).

פרמטר נבדק	cyp79B2 cyp79B3	tgg1 tgg2	atr-1D	מובהקות מבחן F
זמן בדקות:				
עד הטעימה הראשונה	5±0.8	6±0.9	5±0.5	0.183
זמן הטעימה הראשונה	1.5±0.1	1.55±0.2	1.32±0.4	0.23
מספר כולל של הטעימות	**17±3**	**15±2**	**43±2**	**0.002**
זמן כל הטעימות	**45±6**	**39±3**	**19±2.2**	**0.002**
הזנה מהעצה G	**7.3±1.1**	**6.1±1.3**	**16.3±1.1**	**0.012**
הזרקת רוק לשיפה E1	3.1±0.7	4.9±0.2	4.4±0.8	0.331
הזנה מהשיפה E2	**66±3**	**39±5.1**	**9±0.31**	**0.0001**
מסלול בין התאים (C+B+A)	**137±4**	**145±7**	**201±3**	**0.009**

טבלה 4. השוואת נתוני EPG של כנימת עש הטבק מתת המין Q על המוטנטים cyp79B2 cyp79B3, tgg1 tgg2 ו- atr-1D (שורות מודגשות מראות פרמטרים מובהקים סטטיסטית בין שלושת המוטנטים).

פרמטר נבדק	cyp79B2 cyp79B3	tgg1 tgg2	atr-1D	מובהקות מבחן F
זמן בדקות:				
עד הטעימה הראשונה	4±0.3	2±0.2	3.2±0.7	0.07
זמן הטעימה הראשונה	1.53±0.3	1.59±0.4	0.9±0.1	0.09
מספר כולל של הטעימות	21±1.3	18±1.7	17±4	0.113
זמן כל הטעימות	**44±2**	**37±3**	**7±1**	**0.001**
הזנה מהעצה G	5.1±0.5	4.1±0.4	3.6±0.21	0.112
הזרקת רוק לשיפה E1	4.1±0.11	3.2±0.2	3.9±0.3	0.11
הזנה מהשיפה E2	37±3	34±2.1	31±1.9	0.09
מסלול בין התאים (C+B+A)	**101±3**	**105±6**	**99±4.1**	**0.11**

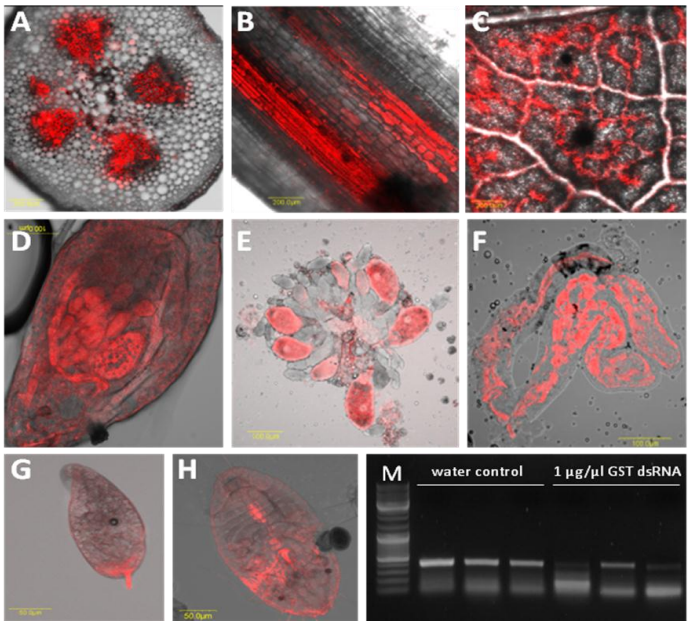
מהתוצאות המוצגות בטבלאות 1-4 ניתן לראות שבדרך כלל לוקח פחות זמן לכנימת עש הטבק להגיע עד לשיפה בצמחים שאינם מייצרים רמות גבוהות של אנדול גלוקוזינולאטים, והיא גם ניזונה יותר זמן מהשיפה בצמחים אלה. כשמשווים את שני תת המינים B ו- Q ניתן לזהות שתת המין Q מסתגל טוב יותר לצמחים עם תכולה גבוהה של אנדול גלוקוזינולאטים וזה מתבטא בפרמטרים עם ערכים דומים כגון מספר הטעימות ואורך ההזנה מהשיפה. תוצאה זו מאששת את העובדה שתת המין Q מסתגל טוב יותר לחומרים טוקסיים בצמחים.

5. איסוף רוק והתפקיד שלו בתגובה לצמחים, ותגובת הצמחים לרוק

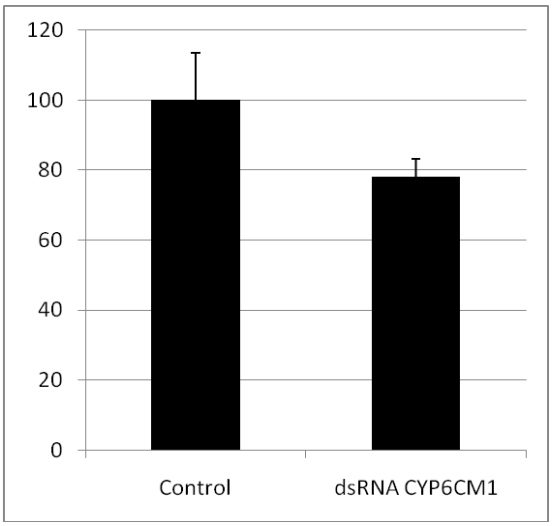
בשנה השנייה של המחקר נעשה איסוף רוק המופרש למצע מלאכותי כמוצג בתוכנית המקורית. הרוק הורץ על ג׳לים של חלבונים ובנדים מהג׳לים האלה נוקו נשלחו לריצוף על מנת לקבוע את הרכב הרוק המופרש על ידי החרקים. בנוסף, פרקציות מהרוק שנוקה מהמצע המלאכותי שימשו למריחה על עלי אראביופסיס מהאקוטיפ Col-0. לאחר המריחה נאספו דגימות מהצמחים הללו והם שימשו לאנליזה של פרופיל גלוקוזינולאטים כללי מהצמחים, על מנת לקבוע אם הרוק המנוקה מהפרשות הכנימה גורם לשינוי בפרופיל הגלוקוזינולאטים. ההשוואה בניסויים הללו נעשית על ידי הזנת כנימות ישירות על צמחים וקביעת פרופיל התגובה של הצמח. התוצאות משני הניסויים (מריחת רוק והזנה ישירה של כנימות) יושוו על מנת לקבוע את המרכיבים ברוק (לפי אנליזת ההרכב שלהם) גורמים לתגובה בצמחים. למרות שהתוכנית הייתה לסיים את האנליזה בשנה השלישית, בגלל בעיות שונות, חלקן בירוקרטיות, האנליזה של התוצאות התעכבה ולא הושלמה עד למועד כתיבת הדו״ח.

6. השתקת גנים

כפי שהוצע בתוכנית המקורית, 10 גנים קנדידאטים ישמשו לבדיקת השיטה שפיתחנו להשתקה בכנימה. בשנה השלישית המשכנו לפתח את פרוטוקול ההשתקה דרך הזנה על צמחים. הפרוטוקול מבוסס על הזנת כנימות מצמחים מנותקים שהושרו בתמיסה המכילה dsRNA ספציפי המכוון להשתקת גן מסוים. בפיתוח המערכת, השתמשנו ב- RNA דו גדילי מסומן בצבע פלואורוצנטי Cy5 באחד הנוקליאוטידים. הצמחים הושרו בתמיסה למשך שבוע ולאחר מכן כנימות פוזרו על צמחים אלה למשך 48 שעות. באיור 8, ניתן לראות שה- RNA מובל במערכת הובלה של הצמח (A ו- B) ומגיע לכל התאים (C). כשה- RNA נרכש על ידי הכנימה הוא ממלא את חלל הבטן (D) ומגיע למעי האמצעי (F) ולשחלות (E). ביצים וזחלים שהוטלו על צמחים אלה מקבלים את ה- RNA כפי שנראה ב- G-H. ב- M ניתן לראות השתקה יעילה של הגן GST - Glutathione S-transferase שזוהה כמגיב להזנה על הצמחים עם רמות גבוהות של אנדול גלוקוזינולאטים. גן נוסף שהביטוי שלו הושתק על ידי שימוש באותו פרוטוקול הוא הגן CYP6CM1 (איור 9). בימים האלה אנחנו מסיימים את האנליזה של תוצאות האלומינה ובוחרים גנים כמועמדים טובים להשתקה על ידי שימוש בפרוטוקול החדש.



איור 8. נוכחות של רנ״א דו-גדילי מסומן Cy5 בכנימות עש במערכת הזנה עם צמחים. באדום- נוכחות צבע Cy5. בתמונה A-C, נוכחות רנ״א דו-גדילי מסומן Cy5 בצינורות ההובלה ובתאים של צמח כותנה שהושרה ב- RNA מסומן. בכנימות שניזונו על צמח זה ניתן לראות את נוכחות ה- RNA בבטן, במעי ובשחלות (D-F). ביצים שהוטלו על צמח זה וזחלים שהתפתחות עליו גם קיבלו את ה- RNA (G-H). ב- M ניתן לראות השתקה של הגן GST.



איור 9. אחוז ביטוי יחסי של הגן cyp6cm1 במעי מכנימת עש הטבק מתת המין אחרי האכלה של 24 שעות על צמחים מושרים בתמיסת RNA דו גדילי.

דיון

במחקר זה הושם דגש על התגובה של כנימת עש הטבק, אחד המזיקים הקשים ביותר בחלקאות, לגלוקוזינולאטים אנדוליים, שהם חומרי הגנה טבעיים ממשפחת המצליבים וגם בצמח המודל אראבידופסיס. במחקר נעשה שימוש במוטנטים של אראבידופסיס המבטאים ביתר או בחסר

גלוקוזינולאטים וגם בטיפוסי בר על מנת לחקור את התגובה הביולוגית , הביוכימית והגנומית של הכנימה לחומרי הגנה אלה.

נמצא שהכנימה מזהה כנראה את הרכב החומרים הללו ונדחית מהם בהתאם. כושר ההטלה של הכנימה והבחירה שלה היא פחותה באופן מובהק על צמחים המייצרים רמות גבוהות של אנדול גלוקוזינולאטים , פרמטרים אלה הם גבוהים על מוטנטים של אראבידופסיס שלא מייצרים חומרים אלה. אנליזה גנומית הראתה שכנימת עש הטבק מפעילה מנגנוני הגנה נגד חומרים אלה מאראבידופסיס בדומה למערכות אנזימתיות המופעלות בתגובה לקוטלי חרקים. פיתחנו מערכת השתקת גנים ובדקנו את יעילותה על שני גנים המעורבים בתגובה לחומרים טוקסיים שונים. האנליזה הביוכימית של הרוק מכנימות והשפעתו על צמחים לא הושלמה בגלל חוסר זמן והיא תושלם בעתיד הקרוב.

טיפוח צמחים עמידים נגד חרקים מזיקים, ובמיוחד כנימת עש הטבק מחייב הבנה טובה יותר לאופן שבו הכנימה מגיבה לחומרי הגנה מצמחים. מחקר זה מהווה נדבך חשוב להבנתנו את האינטראקציה המורכבת של חרקים עם צמחים, ותסייע לתוכניות טיפוח המיועדות לשיפור התגובה של צמחים לחרקים, ובכך להפחתת השימוש בתכשירים כימיים רעילים.

פירוט מלא של הפרסומים המדעיים

1. Brumin, M. and Ghanim, M. 2010. Response of the whitefly *Bemisia tabaci* to glucosinolates from *Arabidopsis*. France-Israel Symposium on Genomics of Insect Pests to Agriculture. May 24th-25th. Rehovot, Israel. Oral presentation.

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס ל כל השאלות בקצרה ולעניין , ב -3 עד 4 שורות לכל שאלה) לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת.(שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר. **הערה :** נא לציין הפנייה לדו״ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

1. **מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.**

חקר התגובה הביולוגית והגנומית של כנימת עש הטבק, מזיק עיקרי בארץ ובעולם, להזנה על צמחי אראבידופסיס עם רמות משתנות של אינדול גלוקוזינולאטים, שהינם מטבולוטים משניים במשפחת המצליבים ובאראבידופסיס, אשר להם תפקיד חשוב באינטראקציה עם חרקים ובהגנה של צמחים מפני מחלות ומזיקים. המטרה הכללית היא מציאת פתרונות להתגברות על מזיקים שאינם מבוססים על שימוש תכשירי הדברה כימיים.

2. **עיקרי הניסויים והתוצאות.**

חקרנו בשיטות ביולוגיות וגנטיות את התגובה של שני תת המינים של כנימת עש הטבק לטיפוסי בר ומוטנטים מאראבידופסיס שמייצרים ביתר או בחסר גלוקוזינולאטים אנדוליים. מצאנו הבדלים בתגובה של שני תת המינים בכל השיטות שנבדקו.

3. **מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו . האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?**

המסקנה שאכן אינדול גלוקוזינולאטים משפיעים באופן מובהק על הכנימה כשהיא ניזונה על צמחים על רמות גבוהות שלהם. ההשפעה היא ברמת ההזנה, הפוריות וביטוי הגנים כפי שנמצא בשנה הראשונה ולפי נתוני ה- EPG . תוכנית המחקר השיגה את רוב המטרות שהוצגו בהתחלה.

4. **בעיות שנותרו לפתרון ו / או שינויים) טכנולוגיים , שיווקיים ואחרים (שחלו במהלך העבודה ;התייחסות המשך המחקר לגבי הן , האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר?**

כן, לדעתנו רוב המטרות שהוצבו מההתחלה הושגו. רק החלק של העבודה עם הרוק והאנליזות הביוכימיות עדיין לא הושלם בגלל בעיות בירוקרטיות של רכישת שירותים.

5. **הפצת הידע שנוצר בתקופת הדוח : פרסומים בכתב - ציטוט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי.**

אין עדיין פרסומים בכתב. אך מאמר אחד על התוצאות בכתיבה בימים אלה.

6. **פטנטים - יש לציין שם ומס ' פטנט ;הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום , תאריך , ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי**

העבודה הוצגה בכנס בינלאומי שהתקיים בארץ והפרטים של הכנס וההרצאה שניתנה מופיעים למעלה בפרק הפרסומים.

7. פרסום הדוח :אני ממליץ לפרסם את הדוח: סמן אחת מהאופציות
ללא הגבלה, בספריות ובאינטרנט

האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי ? לא